



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑩ DE 43 06 661 A 1

⑤1 Int. Cl.⁵:
C 12 N 5/22

②1 Aktenzeichen: P 43 06 661.5
②2 Anmeldetag: 3. 3. 93
④3 Offenlegungstag: 8. 9. 94

DE 43 06 661 A 1

⑦1 Anmelder:

Sittinger, Michael, Dipl.-Biol., 91094
Langensendelbach, DE; Bujía, Jesús, Dr.med. Dr.
Univ. Cádiz, 8000 München, DE

⑦4 Vertreter:

Haft, U., Dipl.-Phys.; Czybulka, U., Dipl.-Phys., 80469
München; Berngruber, O., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.,
Pat.-Anwälte, 83457 Bayerisch Gmain

⑦2 Erfinder:

gleich Anmelder

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Verfahren zum Herstellen eines Implantates aus Zellkulturen

⑤7 Mit dem Verfahren wird angestrebt, insbesondere Knorpelzellen in vitro herzustellen. Die Zellen werden hierbei in einer dreidimensionalen Trägerstruktur, vorzugsweise aus einem Polymervlies eingelagert, wobei die Form der Trägerstruktur der Form des späteren Implantates entspricht. Die Trägerstruktur wird anschließend mit einer Nährlösung über eine lange Zeit perfundiert, wodurch sich innerhalb der Trägerstruktur die extrazelluläre Matrix, die die Zellen aneinanderbindet, zumindest teilweise ausbilden kann. Die Trägerstruktur mit der zumindest teilweise ausgebildeten extrazellulären Matrix wird dann implantiert. Bei der anschließenden Resorption der Trägerstruktur bleibt die Form des Implantates durch die dann ausgebildete extrazelluläre Matrix erhalten.

DE 43 06 661 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 07. 94 408 036/200

6/



Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum Herstellen eines Implantates aus Zellkulturen, insbesondere eines Implantates mit Knorpelzellen, wobei diese Zellen auf eine resorbierbare Trägerstruktur aufgebracht und anschließend implantiert werden.

Soll entferntes körpereigenes Gewebe, z. B. Knorpelgewebe ersetzt werden, so ist man bisher auf im wesentlichen zwei Möglichkeiten angewiesen:

1. Das benötigte Gewebe kann Leichen entnommen, konserviert und dann implantiert werden. Hierbei treten in einigen Fällen Immunreaktionen auf.
2. Zum Ersatz des entfernten Gewebes kann Eigen-
gewebe verwendet werden, das dem Patienten an
anderer, nach außen nicht sichtbarer Stelle ent-
nommen und an dem Ort des entfernten Gewebes
implantiert wird. Hier sind keine Immunreaktionen
zu befürchten.

Ein entscheidender Nachteil dieser beiden Verfahren liegt jedoch darin, daß wegen der immer größeren Anzahl von Implantationen insgesamt zu wenig Material vorhanden ist, so daß der gewünschte Ersatz des Gewebes häufig nur unvollständig erfolgt.

Man hat daher ein drittes Verfahren vorgeschlagen, nämlich auf einem Polymerfaserbündel aus resorbierbarem Material in herkömmlicher Weise isolierte und vermehrte Zellen aufzubringen und die Bündel zu implantieren; vgl. C.A. Vacanti et al., Plastic and Reconstructive Surgery, Vol. 8, No. 5, Nov. 1991, S. 753—759. Durch Übereinander- und Nebeneinanderschichtung der Bündel könnte das Implantat quasi dreidimensional modelliert werden. Nach der Implantation wird das Polymermaterial resorbiert, wobei gleichzeitig zwischen den einzelnen Zellen die interzelluläre Matrix aus insbesondere Kollagen aufgebaut werden soll, so daß sich im Endstadium eine in das umliegende Gewebe integrierte und voll funktionsfähige Gewebestruktur ergibt.

Dieses Verfahren ist noch im Versuchsstadium, an Tieren erprobt, jedoch in der Humanmedizin noch nicht angewendet.

Schwierigkeiten dürften sich bei diesem Verfahren bei der Modellierung des gewünschten Implantates ergeben, da eine Formstabilität der übereinander und nebeneinander gelegten Faserbündel während der Resorption des Fasermaterials nicht zu erwarten ist. Außerdem würden sich bei größeren Implantaten Schwierigkeiten mit der Ernährung der einzelnen Zellen ergeben, die im Inneren des Implantates gelegen sind.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren anzugeben, mit der Zellgewebe, insbesondere Knorpelgewebe, in einer für die Implantation günstigen Konfiguration zur Verfügung gestellt wird. Insbesondere soll das Implantat eine gute Formbarkeit und Form-
erhaltung im implantierten Zustand aufweisen und die
Ernährung der einzelnen Zellen im Implantat sicher
gewährleisten.

Diese Aufgabe ist gemäß der Erfindung durch die im Patentanspruch 1 angegebenen kennzeichnenden Merkmale gelöst.

Die grundlegende Idee der Erfindung besteht demnach darin, eine dreidimensionale formstabile Trägerstruktur mit der gewünschten Implantationsform aus einem Material mit einer zusammenhängenden inneren Oberfläche und einem geringen Volumen, z. B. einem

Polymervlies, vorzuformen, in den inneren Hohlraum der Trägerstruktur Zellen einzubringen und die die Zellen aufnehmende Trägerstruktur mit einer Nährlösung zu durchströmen. Sobald sich dann die interzelluläre Matrix zumindest teilweise ausgebildet hat, kann die gesamte dreidimensionale Trägerstruktur implantiert werden.

Durch die dreidimensionale Trägerstruktur wird sichergestellt, daß auch während der Resorption die Zellen mit ihrer interzellulären Matrix formstabil bleiben und die gewünschte Form des Implantats auch nach der Implantation beibehalten wird.

Durch die Perfusion wird sichergestellt, daß auch die innerhalb der Trägerstruktur gelegenen Zellen ausreichend mit Nährlösung versorgt werden und daß diese Versorgung aufrechterhalten bleibt, wenn sich die interzelluläre Matrix zumindest teilweise aufgebaut hat. Durch den Aufbau der Trägerstruktur und gegebenenfalls eine entsprechende Präparation erfolgt der Eintritt der Nährlösung in die Trägerstruktur und deren Durchdringung im wesentlichen nur durch Diffusion, was im übrigen auch der Situation in vivo entspricht. Die Ernährung der in der Trägerstruktur aufgenommenen Zellen durch Diffusion kann im übrigen noch dadurch sichergestellt werden, daß die gesamte Trägerstruktur mit einem Material ummantelt wird, das im wesentlichen nur eine Diffusion zuläßt. Ein solches Material ist z. B. Agarose.

Durch die Ernährung der Zellen in der Trägerstruktur über die Diffusion wird verhindert, daß die Zellenprodukte, insbesondere die für den Aufbau der interzellulären Matrix notwendigen Kollagene und Proteoglycane aus dem Zellverband ausgeschwemmt werden. Das Zurückhalten dieser notwendigen Faktoren, d. h. deren Retention kann noch dadurch verbessert und unterstützt werden, wenn die Perfusion der Trägerstrukturen mit der Nährlösung intervallartig erfolgt. In den Perfusionspausen werden dann die Zellprodukte am Ort gehalten und bilden die Verbindungen mit den Zellen, wohingegen in den Perfusionsphasen auch unerwünschte Zellprodukte aus der Trägerstruktur und der Matrix ausgeschwemmt werden können.

Weitere Ausgestaltungen der Erfindung gehen aus den Unteransprüchen hervor.

Die Erfindung ist in einem Ausführungsbeispiel anhand der Figur näher erläutert, in der das Verfahren hinsichtlich der verwendeten Geräte schematisch dargestellt ist.

In der Beschreibung wird nur auf die Herstellung von Knorpelgewebe in vitro Bezug genommen; es ist jedoch selbstverständlich, daß hier auch andere Zellgewebe entsprechend behandelt werden können.

Für eine Implantation werden patienteneigene Knorpelzellen in herkömmlicher Weise auf einem Kulturmedium vermehrt.

Aus einem resorbierbaren formstabilen Polymerfaservlies wird eine Trägerstruktur hergestellt, deren Form dem späteren Implantat entspricht. Geeignete Vliesmaterialien sind z. B. Polyglykole oder Polylactide. Hieraus lassen sich Vliese herstellen, die eine große innere zusammenhängende Oberfläche bei gleichzeitig minimalem Materialvolumen aufweisen. Die zusammenhängende innere Oberfläche der Trägerstruktur wird mit einem Adhäsionsfaktor, z. B. Poly-L-Lysin beschichtet bzw. benetzt. Diese Benetzung erfolgt z. B. durch Eintauchen der Trägerstruktur in eine Polylysinslösung und anschließende Lyophilisation, d. h. Gefrier-
trocknung, so daß der Adhäsionsfaktor im wesentlichen



die gesamte innere Oberfläche der Trägerstruktur bedeckt.

Wenn in der oben erwähnten Zellkultur eine ausreichende Anzahl von Zellen vorliegt, werden diese in der Suspension mit dem Kulturmedium in die dreidimensionale entsprechend präparierte Trägerstruktur gefüllt. Zur Erhöhung der Viskosität der Suspension kann dieser noch ein resorbierbarer, die Viskosität erhöhender Stoff, z. B. die erwähnte Agarose zugesetzt werden.

Die die Zelle aufnehmende Trägerstruktur wird anschließend mit Agarose ummantelt, indem z. B. die Trägerstruktur in eine 2%ige Agaroselösung eingetaucht wird. Anschließend wird die Trägerstruktur einem Kälteschock unterworfen, z. B. durch Eintauchen in ein kaltes Wasserbad von etwa 4°C, wobei sich die Agarose des Mantels und ebenso die gegebenenfalls die der Suspension zugefügte Agarose verfestigt. Eine derartige Maßnahme erleichtert die folgende Handhabung.

Diese derart präparierte Trägerstruktur ist in der Figur mit 1 bezeichnet und wird in eine Perfusionsapparatur 2 eingesetzt. Diese Apparatur 2 besteht aus einem Gehäuse 3, in dem eine Perfusionskammer 4 vorgesehen ist, in die die Trägerstruktur eingesetzt wird. In das Gehäuse 3 mündet eine Zuführleitung 5 für eine Nährlösung, die zunächst in eine Mischkammer 6 eintritt, in der die Strömung vergleichmäßigt wird, bevor sie in die Perfusionskammer 4 eintritt. An die Perfusionskammer 4 schließt sich dann eine Abflußkammer 7 an, aus der eine Abflußleitung 8 zu einem Auffangbehälter 9 führt. Das Gehäuse 3 der Perfusionskammer 4 ist mit einer Abdeckung 10 überdacht und wird durch eine Heizung 11 auf gleichbleibender Temperatur entsprechend der mittleren Körpertemperatur von 37°C gehalten.

Die eigentliche Perfusionskammer 4 kann noch mit Agarose zumindest teilweise aufgefüllt sein.

Durch die Perfusionskammer 4 wird langsam eine Nährlösung, z. B. die im Handel unter der Bezeichnung Hams F12 erhältliche Lösung geführt. Diese Nährlösung wird durch eine Pumpe 12, z. B. eine peristaltische Pumpe transportiert, die in der Zuleitung 5 angeordnet ist und Nährlösung aus einem Vorratsbehälter 13 ansaugt. Dieser Vorratsbehälter 13 befindet sich z. B. in einem Wasserbad 14 bei einer Temperatur von 4°C. Die zeitliche Transportmenge der peristaltischen Pumpe 12 ist sehr gering und in dem hier vorliegenden Fall für die Herstellung von Knorpelgewebe auf etwa ein Milliliter pro Stunde eingestellt. Damit lassen sich einige Trägerstrukturen — in der Zeichnung sind drei derartige Trägerstrukturen 1 in der Perfusionskammer 4 dargestellt — ausreichend ernähren, wobei diese Trägerstrukturen einen Querschnitt von maximal einer Daumnagelgröße aufweisen.

Die peristaltische Pumpe 12 wird durch einen Zeitgeber 15 intervallartig gesteuert, wobei die Intervalle je nach Größe der Trägerstrukturen und der Perfusionskammer einstellbar sind: In der Praxis werden die Pump- und Pausenintervalle sich im Minuten- bzw. Stundenbereich befinden. Gute Ergebnisse wurden bei Pump- und Pausenintervallen von jeweils ca. 30 Minuten erreicht.

Perfusionsapparaturen sind an sich bekannt. Sie dienen ansonsten dazu, Zellkulturen, die auf einer Membran angeheftet werden, mit kontinuierlichen Bedingungen zu züchten, und ersetzen damit die herkömmlichen Petri-Schalen. Die Membranen mit den aufgebracht Zellkulturen können hierbei durch Schlitze in die Perfusionskammer eingesetzt werden.

Die durch die Perfusionsapparatur 2 geführte Nährlö-

sung diffundiert durch den Mantel aus Agarose in die Trägerstruktur 1, so daß die darin aufgenommenen Zellen ernährt werden. Die Strömung der Nährlösung und die Intervallsteuerung sind so eingestellt, daß die für den Aufbau der interzellulären Matrix notwendigen Zellprodukte nicht weggeschwemmt werden, sondern an ihrem Platz verbleiben. Im Laufe der Zeit bildet sich die interzelluläre Matrix mit ihren Kollagenfasern zwischen den Zellen aus, so daß die Zellen aneinander gebunden werden. Die Trägerstruktur und die Agarose können sich während dieses langdauernden Prozesses zumindest teilweise auflösen. Durch die Ausbildung der interzellulären Matrix bleibt jedoch die vorgegebene Form und damit auch die gewünschte Form des späteren Implantates erhalten.

Ist die interzelluläre Matrix ausreichend ausgebildet, was etwa ab 10 Tagen bis in einigen Wochen der Fall ist, wird die Trägerstruktur aus der Perfusionskammer herausgenommen und implantiert. Im Laufe der Zeit wird die Matrix weitergebildet, während die Trägerstruktur resorbiert wird.

Es konnte gezeigt werden, daß mit einem derartigen Verfahren tatsächlich die interzelluläre Matrix in vitro aufgebaut wird, was bis dato soweit bekannt noch nicht beobachtet wurde.

Es ist des weiteren möglich, sogenannte gewebsmorphogene Faktoren an das Vlies der Trägerstruktur anzulagern. Derartige morphogene Faktoren regen die Zellbildung und die Bildung der interzellulären Matrix und damit die Knorpelbildung an. Derartige Faktoren können entweder bereits in die Trägerstruktur während der Bildung der interzellulären Matrix in der Perfusionskammer oder nach der Implantation in die Trägerstruktur eingebracht werden. Eine elegante Lösung besteht darin, den gewebsmorphogenen Faktor direkt an das Vliesmaterial zu koppeln oder an einen Antikörper zu koppeln und das Vliesmaterial der Trägerstruktur mit Haptinen zu versehen, an die sich die Antikörper anlagern. Dadurch wirken diese Faktoren nur lokal im Bereich der Trägerstruktur.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Herstellen eines Implantates aus Zellkulturen, insbesondere Knorpelzellen, wobei die Zellen auf einer resorbierbaren Trägerstruktur aufgebracht und anschließend gemeinsam mit dieser implantiert werden, **gekennzeichnet durch folgende Merkmale:**

es wird eine dreidimensionale, im wesentlichen formstabile entsprechend der gewünschten Form des Implantats vorgeformte Trägerstruktur mit einer zusammenhängenden inneren Oberfläche und einem geringen Volumen verwendet;

in den inneren Hohlraum der Trägerstruktur werden die Zellen eingebracht;

die die Zellen aufnehmende Trägerstruktur wird mit einer Nährlösung perfundiert;

nach zumindest teilweiser Ausbildung einer die Zellen aneinander bindenden interzellulären Matrix wird die Trägerstruktur implantiert.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Trägerstruktur ein Vlies aus Polymerfasern, insbesondere Polyglykolen oder Polylactiden ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Trägerstruktur, bevor die Zellen in diese eingebracht werden, mit Adhäsions-



faktoren, insbesondere Poly-L-Lysin, versehen wird.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Adhäsionsfaktoren durch Lyophilisation auf die innere Oberfläche der Trägerstruktur aufgebracht werden. 5

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der innere Hohlraum der Trägerstruktur so gestaltet und dimensioniert ist, daß die Nährlösung durch die Trägerstruktur diffundiert. 10

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die die Zellen aufnehmende Trägerstruktur mit einem Material, insbesondere Agarose, ummantelt wird, durch das die Nährlösung hindurchdiffundieren kann. 15

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Trägerstruktur mit den darin aufgenommenen Zellen intervallartig durchströmt wird, so daß sich an eine Perfusionsphase jeweils eine Pause anschließt. 20

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Trägerstruktur mit den darin aufgenommenen Zellen zur Perfusion in eine Perfusionsskammer eingesetzt wird. 25

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen in der Suspension mit dem Kulturmedium in die Trägerstruktur eingebracht werden, wobei zusätzlich die Suspension mit einem die Viskosität erhöhenden Stoff, vorzugsweise Agarose, versetzt wird. 30

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß an die Trägerstruktur ein gewebsmorphogener Faktor angelagert wird, der die Zellbildung und die Bildung einer interzellulären Matrix unterstützt. 35

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß der gewebsmorphogene Faktor an einen Antikörper gekoppelt wird, der sich an dem Material der Trägerstruktur, vorzugsweise an dort aufgetragenen Haptenen anlagert. 40

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

45

50

55

60

65



- Leerseite -

